

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-502460

(43)公表日 平成9年(1997)3月11日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 0 7 K 14/54	Z N A	8517-4H	C 0 7 K 14/54	Z N A
A 6 1 K 38/00	A D F	9051-4C	A 6 1 K 48/00	A D T
38/16	A B J	9637-4B	C 1 2 P 21/02	K
48/00	A D T	9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/09		9051-4C	A 6 1 K 37/04	A B J
審査請求 有 予備審査請求 未請求(全 24 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平8-518562
 (86)(22)出願日 平成7年(1995)12月13日
 (85)翻訳文提出日 平成8年(1996)7月25日
 (86)国際出願番号 PCT/IT95/00216
 (87)国際公開番号 WO96/18648
 (87)国際公開日 平成8年(1996)6月20日
 (31)優先権主張番号 RM94A000805
 (32)優先日 1994年12月14日
 (33)優先権主張国 イタリア (I T)
 (81)指定国 EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, C N, J P, U S

(71)出願人 イスチチュート デイ リセルシュ デイ
 バイオロギア モレコラレ ビー. アン
 ジェレッティ ソシエタ ペル アチオニ
 イタリア国アイ - 00040 ポメジ
 ローマ, ピア ポンティナ ケイエム.
 30. 600
 (72)発明者 シリベルト, ゲンナロ
 イタリア国 アイ - 00124 カサルバ
 ロッコ ローマ, ピアル ゴルジア ディ
 レオンティニ 330/19
 (74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 受容体複合体三次元モデル化に基づくヒトインターロイキン-6のスーパーアゴニスト、アンタゴニストおよびスーパーアンタゴニストを選択する方法

(57)【要約】

インターロイキン-6 (I L-6) に類似のサイトカインの群 (すなわち、オンコスタチン (Oncostatin) M (O S M)、白血病阻害因子 (L I F)、毛様神経栄養因子 (CiliaryNeurotrophicFactor) (C N T F)、およびインターロイキン11 (I L-11)) のリガンドは、膜分子g p 1 3 0はその一部である受容体複合体の形成を誘発することは公知である。本発明は、ヒトインターロイキン6のスーパーアゴニスト、アンタゴニスト又はスーパーアンタゴニストの選択のための方法であり、以下の操作よりなる：－ ウシ顆粒球コロニー刺激因子 (b G-C S F) のアミノ酸配列を該ホルモンの配列と比較し；－ 前記比較に基づき、該ホルモンの三次元モデルを作成し、こうして特異的受容体と相互作用する部位を形成する残基 (部位1) とg p 1 3 0と相互作用する部位を構成する残基 (部位2) を同定する。本発明は、ヒトインターロイキン-6のこれらの部位の同定と、野性型ホルモンに関して、特異的受容体 (スーパーアゴニストおよびスーパーアンタゴニスト) について高親和性を有するか又はg p 1 3 0に対する親和性が低下

しているか又は全くない (アンタゴニストおよびスーパーアンタゴニスト) 変種の単離を可能にする。本発明はまた、インターロイキン-6の特異的スーパーアゴニストおよびスーパーアンタゴニストの入手法、および野性型インターロイキン-6に依存するヒトミエロマ細胞の増殖の低投与量阻害物質としてのスーパーアンタゴニストの使用を記載する。

【特許請求の範囲】

1. 以下の操作よりなる、インターロイキン6のスーパーアゴニスト、アンタゴニストおよびスーパーアンタゴニストを選択するための方法：

- ー ウシ顆粒球コロニー刺激因子（b G-C S F）のアミノ酸配列を該ホルモンの配列と比較し；そして
- ー 前記比較に基づき、それぞれ特異的受容体と相互作用する部位を形成する残基（部位1）と g p 1 3 0 と相互作用する部位を構成する残基（部位2）の同定を可能にする、該ホルモンの三次元構造を作成する。

2. 以下の操作をさらに含んでなる、請求項1に記載のインターロイキン6のスーパーアゴニストを選択するための方法：

- ー 繊維状ファージ蛋白との融合生成物の形で存在するインターロイキン6の以下の野性型残基の突然変異を含有する一連のファージライブラリーの產生：Ser 22, Glu 23, Asp 26, Arg 30, Leu 33, Ser 37, Arg 40, Glu 42, Ser 52, Ser 53, Ala 56, Leu 57, Glu 59, Asn 60, Leu 62, Leu 64, Pro 65, Lys 66, Met 67, Ala 68, Glu 69, Lys 70, Asp 71, Phe 74, Gln 75, Ser 76, His 164, Leu 165, Arg 168, Ser 169, Lys 171, Glu 172, Phe 173, Glu 175, Ser 176, Ser 177, Leu 178, Arg 179, Ala 180, Leu 181, Arg 182, Gln 183, Met 184；
- ー インターロイキン6突然変異体を発現するファージの混合集団からの、野性型インターロイキン6より大きい特異的受容体に対する親和性を有するものの選択；そして
- ー 選択されたファージ粒子から抽出されたDNAの配列決定により、最適の受容体結合体アミノ酸配列の同定、但し、3つの置換 Gln175Ile/Ser176Arg/Gln183Alaを有するh I L-6分子は除く。

3. 請求項2に記載のインターロイキン6のスーパーアゴニストを選択するための方法であって、M 1 3の蛋白p I I Iとの融合生成物として存在するインターロイキン6の野性型残基の突然変異を有する、一連のファージライブラリーを產生する上記方法。

4. 以下の操作をさらに含んでなる、請求項1に記載のインターロイキン6

のアンタゴニストを選択するための方法：

- ー 従来の分子生物学的方法を用いる、g p 1 3 0 との相互作用の部位の一部を形成することが同定されている請求の範囲第1項記載の残基 (Arg 30, Tyr 31, Gly 35, Ser 37, Ala 38, Ser 118, Lys 120, Val 121, Gln 124, Phe 125, Gln 127, Lys 128およびLys 129) の突然変異；
- ー 特異的受容体に対する親和性が正常であり、生物活性の低下又は欠失を示すインターロイキン6の変種を同定するための、前述のように産生された突然変異体の特異的インターロイキン6受容体に対する生物学および親和性の評価；そして
- ー 野性型インターロイキン6の生物活性のアンタゴニストとしてのインターロイキン6の前述の変種の評価、但し、以下の置換を有する3つのh I L - 6分子は除く：

Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Arg/Val121Asp

Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Phe/Val121Asp

Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Leu/Val121Asp。

5. 請求項2から4に記載のインターロイキン6のスーパーアンタゴニストを選択するための方法であって、前述のように示されたアンタゴニスト活性に関与するアミノ酸配列の変種を、インターロイキン6の特異的受容体の親和性の増加に関与するアミノ酸突然変異と組合せることによる上記方法、但し、Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Arg/Val121Asp/Gln175Ile/Ser176Arg/Gln183Alaの7つの置換を有するh I L - 6分子は除く。

6. 請求項5に記載のインターロイキン6のアンタゴニスト又はスーパーアンタゴニストを選択するための方法であって、前述のように同定された残基の突然変異誘発を、ポリメラーゼ連鎖反応、プライマー伸長、オリゴヌクレオチド指令突然変異誘発、およびこれらの組合せよりなる群から選択される分子生物学的方法を用いて行う上記方法。

7. 請求項3に記載のインターロイキン6突然変異体であって、特異的受容体に対して親和性の増加を示し、フェニルアラニン74、グルタミン75およびセリン76残基の複数の置換とともに、突然変異グルタミン175イソロイシン

セリン176アルギニンおよびグルタミン183アラニンを有する、上記突然変異体。

8. 請求項7に記載のインターロイキン6突然変異体であって、特異的受容体に対して親和性の増加を示し、

ー グルタミン75チロシン、セリン76イソロイシン、グルタミン175イソロイシン、セリン176アルギニンおよびグルタミン183アラニン；

ー フェニルアラニン74チロシン、グルタミン75フェニルアラニン、セリン76イソロイシン、グルタミン175イソロイシン、セリン176アルギニンおよびグルタミン183アラニン；そして

グルタミン75チロシン、セリン76リジン、グルタミン175イソロイシン、セリン176アルギニンおよびグルタミン183アラニン、

よりなる群から選択される突然変異体を含有し、該突然変異体は特異的受容体に対してそれぞれ27.7倍、23.5倍および42倍の親和性の増加を示す、上記突然変異体。

9. 請求項4から6までから得ることのできる、残基31、35、74、75、76、118、121、175、176、183に同時置換を有し、そのアンタゴニスト性を受容体への高親和性と組合せることにより、低投与量でスーパーアンタゴニスト作用を有する、ヒトインターロイキン6突然変異体。

10. 請求項9に記載のヒトインターロイキン6突然変異体であって、該突然変異は：

ー チロシン31アスパラギン酸、グリシン35フェニルアラニン、セリン118アルギニン、バリン121アスパラギン酸、グルタミン75チロシン、セリン76イソロイシン、グルタミン175イソロイシン、セリン176アルギニンおよびグルタミン183アラニン；

ー チロシン31アスパラギン酸、グリシン35フェニルアラニン、セリン118アルギニン、バリン121アスパラギン酸、フェニルアラニン74チロシン、グルタミン75フェニルアラニン、セリン76イソロイシン、グルタミン175

イソロイシン、セリン 176 アルギニンおよびグルタミン 183 アラニン；そして

ー チロシン 31 アスパラギン酸、グリシン 35 フェニルアラニン、セリン 118 アルギニン、バリン 121 アスパラギン酸、グルタミン 75 チロシン、セリン 76 リジン、グルタミン 175 イソロイシン、セリン 176 アルギニンおよびグルタミン 183 アラニン、

よりなる群から選択され、該突然変異体はその増殖が I L - 6 依存性である感受性のあるヒト細胞、ミエローマ細胞を包含する、に及ぼす野性型インターロイキン 6 の生物活性を阻害することができる、上記突然変異体。

11. ヒトにおける血小板減少症の治療用薬剤の調製、および骨髄移植や遺伝子治療のためのヒト造血始原細胞の体外増殖方法のための、請求項 7 又は 8 に記載のスーパーアゴニストの使用。

12. インターロイキン - 6 の過剰産生を特徴とする疾患、特に多発性骨髄腫、リウマチ様関節炎、閉経後骨粗鬆症および全身性エリテマトーデスの治療用薬剤の調製のための請求項 10 に記載のインターロイキン - 6 突然変異体の使用。

【発明の詳細な説明】

受容体複合体三次元モデル化に基づくヒトインターロイキン-6のスーパーアゴニスト、アンタゴニストおよびスーパーアンタゴニストを選択する方法

本発明は、三次元モデル化に基づくヒトインターロイキン-6（以後、hIL-6又はIL-6とも呼ぶ）のスーパーアゴニスト、アンタゴニストおよびスーパーアンタゴニストを選択する方法に関する。

公知のようにWO 92/21029（ジェネンティック社（Genetic Inc.））は、成長ホルモンおよび類似の構造コンフォメーションを有するリガンドのアゴニスト又はアンタゴニストの測定方法を記載する。アゴニストやアンタゴニストの可能性のあるものを成長ホルモンの受容体と接触させると、そのアゴニスト又はアンタゴニストの可能性のあるものと、アゴニスト作用を受けるもの又はアンタゴニスト作用を受けるものの2つの分子との三次元複合体を形成する。リガンド分子に誘導される受容体のダイマー（二量体）化により、リガンドは2つの異なる相互作用部位（部位1と部位2）を有し、突然変異誘発を利用してアゴニスト又はアンタゴニストを作成することができることを結論できる。

インターロイキン-6（IL-6）に類似のサイトカインの群（すなわち、オンコスタチン（Oncostatin）M（OSM）、白血病阻害因子（LIF）、毛様神経栄養因子（Ciliary Neurotrophic Factor）（CNTF）、およびインターロイキン11（IL-11））のリガンドは、膜分子gp130がその一部である受容体複合体の形成を誘発する。この受容体複合体において、これらのサイトカインと膜分子gp130のそれぞれはいつも共通成分として存在する。従って部位1と部位2はこのクラスのホルモンの2つの異なる分子に結合（部位1は特異的受容体に、そして部位2はgp130に結合）するという仮説が立てられる。以下より明らかなように、ヒト成長ホルモン（hGH）受容体と問題のホルモンの受容体の配列との機能的類似性に基づき受容体複合体の三次元モデルを作成することにより、2つの部位の同定が可能である。野性型ホルモンについて繊維状ファージライブラリー（例えば、野性型および突然変異体型の両方で、ホルモ

を有するM13)を作成することにより、特異的受容体に対して大きい親和性を有する変種(スーパーアゴニスト又はスーパーアンタゴニスト)を単離することができる。

本発明において、例えば本発明のIL-6とWO92/21029記載のものの三次元モデルの差から、部位2の成分としてらせんAとCの異なる残基を同定することができる。実際本発明では、成長ホルモンではなくIL-6の作成について、成長ホルモンではなく異なるサイトカインの構造を鋳型として使用した。

ヒトインターロイキン6分子のモデル化は以下のように行う。化学的文献の入手できるデータから、ヒトインターロイキン6のアミノ酸配列は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)のアミノ酸配列と類似している。X線結晶解析により得られたウシ顆粒球コロニー刺激因子(bG-CSF)の三次元構造を鋳型として用いて、残基16~184のヒトIL-6の三次元構造を作成した。まずヒトIL-6のアミノ酸配列をbG-CSFと並べた。並べたものから、コンピューター化双方向グラフ化装置(computerized interactive graphic unit)を用いて、bG-CSF三次元構造中のアミノ酸残基を、対応するヒトIL-6の残基で置換した。欠失又は挿入が起きる部位(これはインターロイキン6分子の局所的構造の差を示唆する)には、分子モデル化プログラムに提供されるオプションを用いて調整を行なった。

bG-CSF構造に基づきインターロイキン6の三次元モデルにより、ヒトインターロイキン6とその2つの受容体の相互作用の2つの部位が同定できた:低親和性受容体gp80(部位1)と高親和性シグナル変換受容体(signal transducer receptor)gp130(部位2)。この2つの部位を同定するために以下の方法を使用した。配列の比較から、造血系受容体ファミリーのすべてのメンバーは、サイトカイン結合ドメインとして知られているドメインを共有するという事実から、これらは互いに関連していることは公知である。この配列の類似性はまた、種々の受容体の対応する部分(インターロイキン6の2つの受容体であるgp80とgp130を含む)の構造が類似している可能性が高いことを示す。これらの受容体に結合するサイトカインはすべて4らせん塊(four helix bundle)を有する(又は有すると予測される)という観察事実は、サイトカイ

ン結合ドメインによるこれらのサイトカインとその受容体の間の相互作用は、同一ではなくても非常によく似た生物活性のある複合体であるに違いないという考えを支持している。

これらの受容体複合体の1つ（成長ホルモンと、成長ホルモンのダイマー性受容体（すなわち、GHbp）の細胞外ドメインにより作成される複合体）の三次元構造がX線結晶解析により測定されたことを考慮すると、我々がbG-CSFに基づく作成したヒトインターロイキン6のモデルから、インターロイキン6とその2つの受容体gp80（部位1）とgp130（部位2）の間の相互作用の可能な部位を同定することができる。本発明によりこれは、成長ホルモン受容体のX線結晶解析構造により提供される座標に基づきgp80とgp130の構造モデルを作成し、成長ホルモンを我々のbG-CSFから作成したヒトインターロイキン6のモデルで置換することにより行なった（図1参照）。

公知のように、インターロイキン6は184アミノ酸のポリペプチドであり、既に記載されているように、らせんサイトカインのクラスに属する。インターロイキン6は種々のタイプの細胞により産生される多機能性サイトカインである。これは種々の系統の細胞（例えば、免疫系の細胞、肝細胞、腎細胞、造血幹細胞、ケラチン細胞およびニューロン）に対して分化および増殖因子として作用する。

インターロイキン6スーパーアゴニストの産生により、多くの重篤な疾患の治療において、野性型のインターロイキン6に必要とされるよりも少ない治療投与量を使用することができる。実際インターロイキン6は、乳癌、白血病、および感染症又は骨髄始原細胞の障害に関連した疾患の治療への応用において重要かつ有望である。

さらにインターロイキン6のスーパーアゴニストは、骨髄移植や遺伝子治療において、骨髄始原細胞の体外増殖方法に使用されるであろう。

一方ヒトインターロイキン6のアンタゴニスト又はスーパーアンタゴニストの産生により、その過剰産生を特徴とする多くの疾患（例えば、慢性自己免疫疾患、ミエローマ／形質細胞腫、閉経後骨粗鬆症および癌悪液質）においてインターロイキン6を阻害する。

本発明のインターロイキン6のスーパーアゴニスト、アンタゴニスト又はスー

パーアンタゴニストの選択のための方法は、以下の操作よりなる：

- ー ウシ顆粒球コロニー刺激因子（b G-C S F）のアミノ酸配列を該ホルモンの配列と比較し；
- ー 前記比較に基づき、該ホルモンの三次元モデルを作成し、こうしてそれぞれ特異的受容体と相互作用する部位を形成する残基（部位1）とg p 130と相互作用する部位を構成する残基（部位2）が同定できる。

インターロイキン6のスーパーアゴニストの選択のために、本発明の方法は、以下の追加の操作よりなる：

- ー インターロイキン6の以下の野性型残基の突然変異を含有する一連のファージライブラリー（繊維状ファージ蛋白との融合生成物の形で存在する）の產生：
らせんA：

Ser 22, Glu 23, Asp 26, Arg 30, Leu 33, Ser 37, Arg 40, Glu 42；

ループA B：

Ser 52, Ser 53, Ala 56, Leu 57, Glu 59, Asn 60, Leu 62, Leu 64, Pro 65, Lys 66, Met 67, Ala 68, Glu 69, Lys 70, Asp 71, Phe 74, Gln 75, Ser 76；

らせんD：

His 164, Leu 165, Arg 168, Ser 169, Lys 171, Glu 172, Phe 173, Glu 175, Ser 176, Ser 177, Leu 178, Arg 179, Ala 180, Leu 181, Arg 182, Gln 183, Met 184、

- ー 個々のファージライブラリーに属しインターロイキン6突然変異体を発現するファージの混合集団から、野性型インターロイキン6より大きい特異的受容体に対する親和性を有するものの選択；そして
- ー 選択されたファージ粒子から抽出されたDNAの配列決定により、最適の受容体結合体アミノ酸配列の同定。

この場合、M 13 p I I I蛋白との融合生成物として存在するインターロイキン6の野性型残基の突然変異を有する、一連のファージライブラリーが產生される。

本発明のインターロイキン6のアンタゴニストを選択するための方法（およびヒトインターロイキン6蛋白とその受容体鎖の分子モデル化のための前述の操作

法とともに）は、以下の操作よりなる：

- ー 従来の分子生物学的方法を用いる、g p 1 3 0との相互作用の部位の一部を形成することが同定されている残基（Arg 30, Tyr 31, Gly 35, Ser 37, Ala 38, Ser 118, Lys 120, Val 121, Gln 124, Phe 125, Gln 127, Lys 128 および Lys 129）の突然変異誘発；
- ー 特異的受容体に対する親和性が正常であり、生物活性の低下又は欠失を示すインターロイキン6の変種を同定するための、前述のように産生された突然変異体の特異的インターロイキン6受容体に対する生物活性および親和性の評価；そして
- ー ヒト細胞株に及ぼす野性型インターロイキン6の生物活性のアンタゴニストとしてのインターロイキン6の前述の変種の評価。

インターロイキン6のスーパーアンタゴニストを得る場合は、前述のように同定されたアンタゴニスト活性に関与するアミノ酸配列の変種を、インターロイキン6の特異的受容体の親和性の増加に関与するアミノ酸突然変異を組合せることによる。

インターロイキン6のアンタゴニスト又はスーパーアンタゴニストを得るための方法では、前述のように同定された残基の突然変異は、ポリメラーゼチェーン反応、プライマー伸長、オリゴヌクレオチド指令突然変異誘発、およびこれらの組合せよりなる群から選択される分子生物学的方法を用いて行われる。

本発明は、インターロイキン6のスーパーアゴニスト、アンタゴニスト又はスーパーアンタゴニストの選択に限定されない。それどころか本発明は、前記選択方法により得られた分子にも拡張される：すなわち、h I L - 6 のスーパーアゴニスト（但し、I L - 6 I R A と呼ばれる分子および3つの置換 Glu175Ile/Ser 176Arg/Glu183Ala を有するものは除く）；h I L - 6 のアンタゴニスト（但し、以下の置換を有する3つの分子は除く：

Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Arg/Val121Asp(DFRD)

Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Phe/Val121Asp(DFFD)

Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Leu/Val121Asp(DFLD)) ;

およびインターロイキン6のスーパーアンタゴニスト（但し、S a n t 1と呼ば

れ以下の7つの置換を有する分子は除く：Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Arg/Val121Asp/Gln175Ile/Ser176Arg/Gln183Ala）。

ここまで本発明の対象を一般的に説明してきた。本発明の目的、特徴、利点および利用方法をより理解しやすくするため、以下の例により本発明の具体的な実施態様をより詳細に説明する。

図1は、ヒトインターロイキン6の部位1と部位2を同定するために応用した方法を例示する。

図2は、濃度の増加とともに、アンタゴニスト Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Arg/Val121Asp（図においては1文字コードを使用した）に対する、本発明の3つのスーパーアンタゴニスト（すなわち、S a n t 3、S a n t 4およびS a n t 5）の力価の増加を示す。

寄託

大腸菌K12株（E.coli K12）（制限酵素S a l Iの認識部位から制限酵素N o t Iの認識部位までに、野性型ヒトインターロイキン6のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含有する、プラスミドp H e n Δ h I L - 6を用いて形質転換した）を、1993年6月10日にナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリーン・バクテリア・リミティッド（The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIMB)、アバディーン（Aberdeen）、スコットランド、英国）に寄託し、整理番号NCIMB 40563を得た。

例1

ABループ中のアミノ酸残基の突然変異誘発によるインターロイキン6のスーパーアンタゴニストの選択のための本発明の方法の応用

作戦は、後ろにファージM13の蛋白p I I Iの最後の157アミノ酸が続き、前に配列P e l B（これは合成蛋白を細胞周辺スペースに移動させる）を有す

る、h I L - 6 をコードするすべての領域を含有するハイブリッド遺伝子（配列番号：1）を構築することよりなる。

この構築体は、その表面に正しく折り畳まれた生物活性を有するヒトインターロイキン6を発現するファージミド (phagemid) 粒子を得ることを可能にする。

WO 95 / 00852 に記載の I L - 6 I R A 変種（置換体Glu175Ile/Ser176 Arg/Gln183Ala）から出発して、インターロイキン6の残基A s p 71、P h e 74、G l n 75、およびS e r 76の突然変異を有し、受容体に対して野性型ヒトインターロイキン6より約5倍大きい親和性を有するファージライブラリーを、繊維状ファージM13との融合生成物の形で作成した。このライブラリーはプライマー伸長法により作成した。突然変異誘発性オリゴヌクレオチドはI L - 6 D F Q Sであり、これは95ヌクレオチドオリゴである（その配列は配列番号：2である）。プライマーI L - 6 D F Q Sは、アミノ酸71（野性型A s p）、74（野性型P h e）、75（野性型G l n）および76（野性型S e r）をコードするコドンに縮重がある。オリゴヌクレオチドI L - 6 A Bプライマー（その配列は配列番号：3である）を、プライマー伸長反応のプライマーとして使用した。この2つのオリゴヌクレオチドをインビトロでアニーリングし、アニーリング化したオリゴヌクレオチドをプライマー伸長反応の基質として使用した。こうして得られた2本鎖DNA断片を次に、消化し、プラスミドp H e n Δ h I L - 6 に連結させて、野性型配列を突然変異配列で置換した。連結生成物を細菌に挿入し、約300万の独立の形質転換体を得た。形質転換した細菌をM13 K07ヘルパーバクテリオファージで感染させて、ファージライブラリー（プラスミドのライブラリー）を作成した。

s h r I L - 6 R に対するモノクローナル抗体でコーティングした磁性ビーズと、s h r I L - 6 R およびs h r g p 130の存在下でインキュベートして、ライブラリーを選択した。ファスミド(phasmid)集団はpH 3.6で溶出し、次に細菌中で増幅させた。4サイクルの選択-増幅の後、ランダムに選択したファスミド(phasmid)を突然変異した領域に対して配列決定し、対応する突然変異体インターロイキン6蛋白を適当な細菌株の細胞周辺スペース中で産生させ、イン

ターロイキン6 特異的受容体の結合について試験した。表1は、本発明の方法を用いることにより、特異的受容体に対する親和性が増加しているインターロイキン6 変種（らせんDと領域A-Bの両方に突然変異を有する分子）を選択することが可能であることを示す。

表1

領域A-Bの残基71、74、75および76に追加の突然変異を有するインターロイキン6-IRAの変種の受容体結合性

位置	71	74	75	76	受容体結合 (%)
野性型	Asp	Phe	Gln	Ser	100%
IL-6 IRA	Asp	Phe	Gln	Ser	450%
ファスミドD3-3	Asp	Tyr	Phe	Ile	2350%
ファスミドD4-1	Asp	Tyr	Tyr	Val	2750%
ファスミドD3-7	Asp	Phe	Tyr	Ile	2770%
ファスミドD4-19	Asp	Phe	Tyr	Ser	1800%
ファスミドD4-20	Asp	Phe	Tyr	Lys	4200%
ファスミドD3-16	Asp	Phe	Tyr	Leu	1450%
ファスミドD4-17	Asp	Phe	Phe	Ile	2430%

例2

インターロイキン6のスーパーアンタゴニストを得るための本発明の方法の応用

4つの突然変異Tyr31Asp/Gly35Phe/Ser118Arg/Val121Asp (DFRD) は、WO 95/00852に記載のアンタゴニスト（拮抗作用）性を与える。これらの4つの突然変異を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分子生物学的方法を用いて、特異的受容体結合能（例1に記載）を上昇させることができる突然変異と組合せた。さらに詳しくは：

らせんDのスーパー結合体（super-binder）突然変異とファスミドD3-7（例1に記載）の領域A-Bによる、突然変異体蛋白Sant3の作成；

らせんDのスーパー結合体（super-binder）突然変異とファスミドD3-3（例1に記載）の領域A-Bによる、突然変異体蛋白Sant4の作成；

らせんDのスーパー結合体 (super-binder) 突然変異とファスミドD4-20 (例1に記載) の領域ABによる、突然変異体蛋白 Sant 5 の作成。

9個のアミノ酸置換 (Sant 3と Sant 5) 又は10個のアミノ酸置換 (Sant 4) を有する突然変異体蛋白を、特異的インターロイキン6受容体結

合、およびヒト肝細胞およびミエローマ細胞に及ぼすインターロイキン6の生物活性に拮抗する能力について試験した。表2と図2は、DFRDと Sant 3、Sant 4および Sant 5の特異的受容体結合性とインターロイキン6の生物活性の50%を阻害するのに必要な突然変異体の濃度 (培地1ml当たりの突然変異体のngで示す) とともに示す (ミエローマ細胞は肝細胞より野性型インターロイキン6に対する感受性が高いため、肝細胞は、培地1ml当たり4ngの野性型インターロイキン6で刺激し、ミエローマ細胞は培地1ml当たり0.1ngのインターロイキン6で刺激した)。

表2

突然変異体アンタゴニストの特異的インターロイキン6受容体結合能の関数としてのヒト肝細胞およびミエローマ細胞に及ぼす野性型インターロイキン6生物活性の阻害

アンタゴニスト	受容体結合 (野性型の%)	細胞に対するインターロイキン6活性の50%阻害	
		肝細胞Hep3B	ミエローマ細胞XG-1
DFRD	97%	164 ng/ml	190.0 ng/ml
Sant 3	2800%	2.4 ng/ml	1.85 ng/ml
Sant 4	2000%	2.7 ng/ml	3.90 ng/ml
Sant 5	4500%	2.3 ng/ml	2.45 ng/ml

表から明らかなように、例1に記載のアミノ酸置換体の導入は、親突然変異体DFRDの特異的受容体結合能力をただちに上昇させ、試験した細胞株の両方に及ぼす野性型インターロイキン6生物活性の50%を阻害するのに必要なアンタゴニストの量を低下させ、従って、非常に有効で強力なインターロイキン6スーパーアンタゴニストが作成された。

配列表

一般情報:

(i) 出願人: インスチット・ジ・リセルシェ・ジ・ビオロギア・モレコラレ・
ピー・アンゲレッチ社 (Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P.
Angeletti S. p. A.)

(ii) 発明の名称: 受容体複合体三次元モデル化に基づくヒトインターロイキン
-6 のスーパーアゴニスト、アンタゴニストおよびスーパーアンタゴニストを選
択する方法

(iii) 配列の数: 3

(iv) 連絡住所:

(A) 宛名: ソシエタ、イタリアーナ、ブレベッチ (Societa Italiana
Brevetti)

(B) 通り: ピアッツア・ジ・ピエトラ (Piazaa di Pietra) 、 3 9

(C) 市: ローマ

(D) 国: イタリア

(F) 郵便番号: I - 0 0 1 8 6

(v) コンピューターで読める形式:

(A) 媒体の型: フロッピーディスク 3. 5'', 1. 4 4 メガバイト

(B) コンピューター: I B M P C コンパチブル

(C) オペレーティング・システム: P C - D O S / M S - D O S

Rev 6. 2 2

(D) ソフトウェア: マイクロソフト・ワード 6. 0

(vi) 弁理士/代理人情報:

(A) 氏名: ジ・セルボ・マリオ (博士)

(B) 登録番号:

(C) 参照/整理番号: R M / X 8 8 4 7 1 / P C - D C

(ix) 電話連絡先情報:

(A) 電話: 0 6 / 6 7 8 5 9 4 1

(B) ファックス: 0 6 / 6 7 9 4 6 9 2

(C) テレックス: 6 1 2 2 8 7 ロパート (ROPAT)

(1) 配列番号: 1 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 5 5 5 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖: 1 本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: DNA

(iii) ハイボセティカル配列: なし

(iv) アンチセンス: なし

(v) フラグメント型: 中間部

(vi) 起源:

(A) 合成: 細菌中で産生

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/記号: IL-6 cDNA

(C) 同定方法: ポリアクリルアミドゲル

(xi) 配列: 配列番号: 1:

```

CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA GAT GTA GCC GCC CCA CAC AGA 48
Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg
1           5           10           15
CAG CCS CTC ACG AGC TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC 96
Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile
          20           25           30
CTC GAC GGC ATC TCA GCC TTA AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC 144
Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn
          35           40           45
ATG TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG AAC CTT 192
Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu
50           55           60

```



```

CCA AAG ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC CAA TCT GGA TTC AAT GAG 240
Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu
65          70          75          80
GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT GGT CTT TTG GAG TTT GAG GTA 288
Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val
85          90          95
TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG GAA CAA GCC 336
Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala
100         105         110
AGA GCT GTC CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA 384
Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys
115         120         125
AAG GCA AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT 432
Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn
130         135         140

GCC AGC CTG CTG ACG AAG CTG CAG GCA CAG AAC CAG TGG CTG CAG GAC 480
Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp
145         150         155         160
ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG AGA TCT TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC 528
Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser
165         170         175
AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAG 555
Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
180

```

(2) 配列番号：2 の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：95塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：合成DNA

(iii) ハイボセティカル配列：なし

(iv) アンチセンス：なし

(v) フラグメント型：中間部

(vi) 起源：

(A) 合成：オリゴヌクレオチド合成機

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称／記号：DFQS

(C) 同定方法：ポリアクリルアミドゲル

(xi) 配列：配列番号：2：

GTGAGAGCTC CAAAGAGGCA CTGGCAGAAA ACAACCTGAA CCTTCCAAAG ATGGCTGAAA 60
AANNSGGATG CNNSNNSNNS GGATTCAATG AGGAG 95

(3) 配列番号：3の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：72塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：合成DNA

(iii) ハイボセティカル配列：なし

(iv) アンチセンス：あり

(v) フラグメント型：中間部

(vi) 起源：

(A) 合成：オリゴヌクレオチド合成機

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称／記号：ABプライマー

(C) 同定方法：ポリアクリルアミドゲル

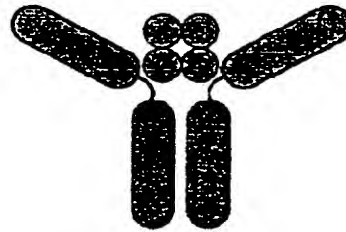
(xi) 配列：配列番号：3：

GGCCTCTAGA TATACCTCAA ACTCCAAAAG ACCAGTGATG ATTTTCACCA GGCAAGTCTC 60
CTCATTGAAT CC 72

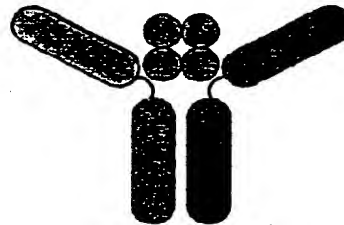
【図1】

モデルの作成

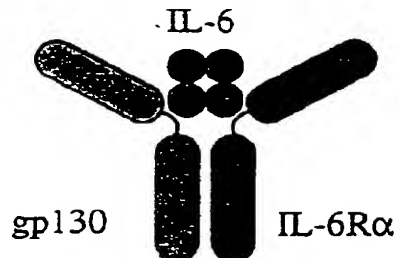
GHとGHbpとの複合体のX線構造



I

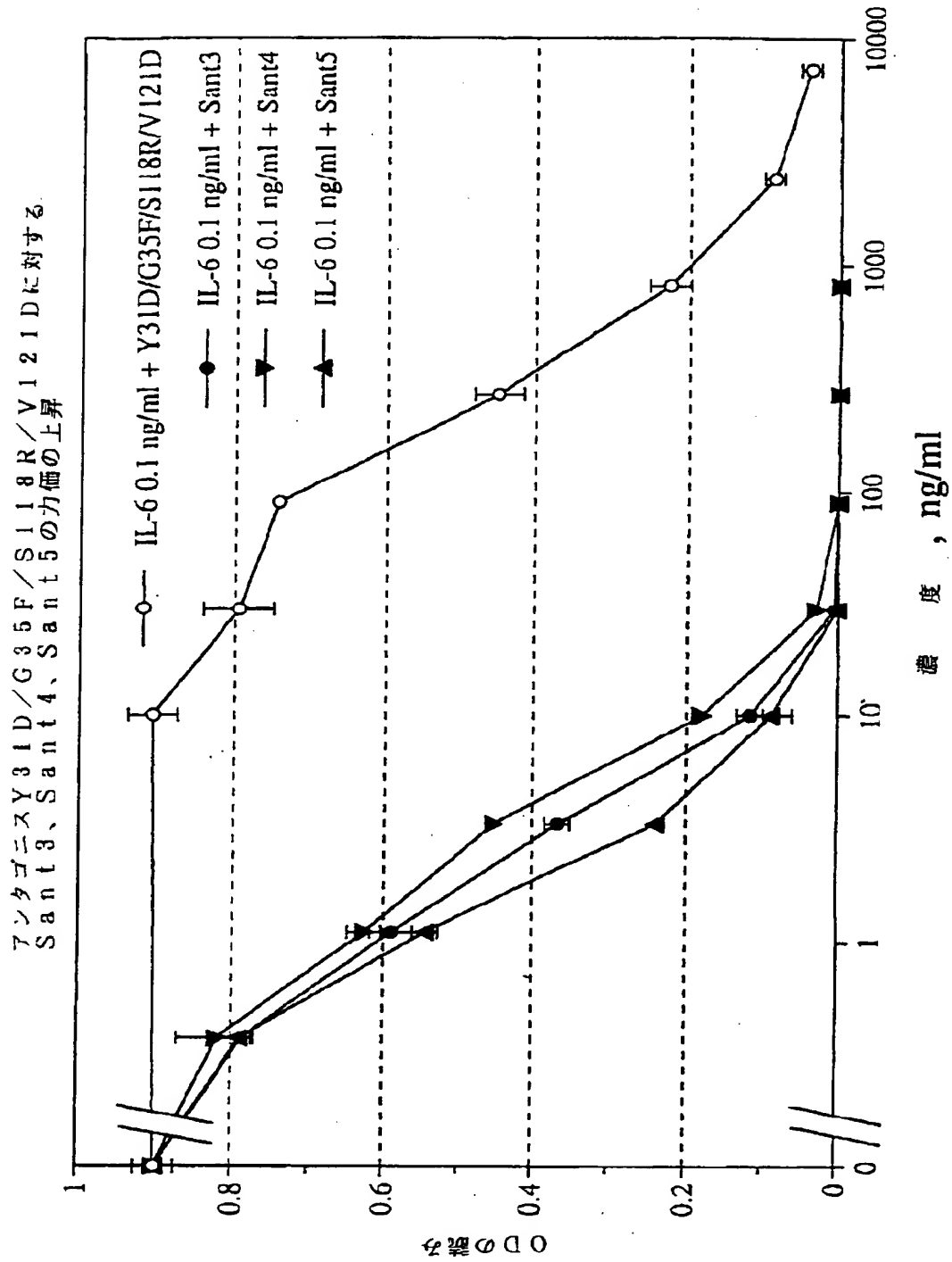
GH-GHbp複合体からgp130とIL-6 α の
サイトカイン結合ドメインのモデルG-CSF X線構造から
IL-6のモデルを作成

GHにIL-6のモデルを置換



第 1 図

【図2】



第 2 図

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IT 95/00216
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/54 A61K38/20 C12N15/24 G01N33/74		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBO JOURNAL, vol. 13, no. 6, 15 March 1994 pages 1357-1367, XP 000565719 SAVINO, R. ET AL. 'Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp 130 activation' * whole disclosure *	1-6
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 90, 1993 XP 000565720 SAVINO, R. ET AL. 'Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor binding site: Implications for its three-dimensional structure' * abstract; figs. 1-3 *	1-3,5,6
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'A' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 March 1996		Date of mailing of the international search report 12.04.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hermann, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IT 95/00216

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 09138 (CETUS ONCOLOGY CORPORATION) 28 April 1994 * claims 1-4 *	9,10,12
X	WO,A,94 11402 (ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.P.A.) 26 May 1994 * page 1; claims *	1
A	J. IMMUNOL. , vol. 153, no. 4, 15 August 1994 pages 1744-1753, XP 000565715 EHLERS, M. ET AL. 'Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction' * abstract; p. 1746, left-hand column, last paragraph; p. 1749-1751 *	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 (information on patent family members)

 Int. Application No.
PCT/IT 95/00216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0-A-9409138	28-04-94	AU-B- 5409294	09-05-94
		CA-A- 2147466	28-04-94
		EP-A- 0672144	20-09-95

W0-A-9411402	26-05-94	CA-A- 2129824	26-05-94
		EP-A- 0667872	23-08-95
		JP-T- 7501947	02-03-95

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	弁内整理番号	F I	
C 1 2 P 21/02		9051-4C	A 6 1 K 37/02	A D F
/(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 サビノ, ロッコ
イタリア国 アイ - 00040 ローマ,
ピア デラ テクニカ 76

(72)発明者 ラーム, アルミン
イタリア国 アイ - 00153 ローマ,
ピアッツァ エス. マリア リベラトリス
18

(72)発明者 トニアッティ, カルロ
イタリア国 アイ - 00142 ローマ,
ピア ベネデット クロセ 26